

## فراوانی زیر گروه های لنفوسیت های T در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور و عوامل موثر بر آن

لیلا کریمی<sup>۱</sup>، پژمان بشکار<sup>۱</sup>، دکتر هدایت اله شیرزاد<sup>۱</sup>، دکتر سلیمان خیری<sup>۲</sup>، مریم راستی<sup>۳</sup>،

دکتر سید محمد کاظم نوربخش<sup>۳</sup>، دکتر بتول پورقصری<sup>۴</sup>\*

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۴</sup>مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۸ اصلاح نهایی: ۹۱/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۲

### چکیده:

زمینه و هدف: از راهکارهای رایج درمانی در بیماران تالاسمی تزریق خون های مکرر و درمان دفع آهن است. عوارض عفونی از مشکلات جدی در بیماران تالاسمی به حساب می آید که می تواند ناشی از ناهنجاری های ایمنونولوژیکی باشد. در مطالعه حاضر فراوانی زیر گروه های اصلی لنفوسیت های T و ارتباط آن ها با سن، میزان تزریق خون، فریتین سرم و درمان دفع آهن مورد بررسی قرار گرفته است. روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۲۷ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد در سال ۱۳۹۰ با محدوده سنی ۳۰-۱۰ سال که بر اساس معیارهای بالینی و آزمایشگاهی تشخیص داده شده بودند، شرکت کردند. گروه شاهد نیز شامل یک گروه ۲۶ نفره از افراد سالم بودند که از لحاظ سن و جنس با بیماران مطابقت داشتند. نمونه خون وریدی در لوله های حاوی سدیم هپارین جمع آوری و پس از لیز گلبول های قرمز با آنتی بادی های منوکلونال نشاندار فلورسنت رنگ آمیزی گردید و مورد آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفت. تعداد سلول ها با توجه به نتایج آنالیز فوق و شمارش خونی محاسبه گردید. نتایج در نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون های Mann-Whitney و همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شدند. یافته ها: تعداد مطلق لنفوسیت ها در بیماران به صورت معنی داری بیش از گروه شاهد و درصد لنفوسیت های T به صورت معنی داری کمتر از گروه شاهد بود ( $P < 0.001$ ). تعداد لنفوسیت های T در هر دو گروه CD4 و CD8 بین بیماران و گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشت ( $P > 0.05$ ). فراوانی لنفوسیت های  $CD3+CD27+$  در هر دو نوع سلول CD4 و CD8 در بیماران کمتر از گروه کنترل بود که این تفاوت تنها در زیر گروه CD4 به طور جزئی معنی دار بود ( $P = 0.07$ ). تعداد لنفوسیت های  $CD3+CD4+CD27+$  با میزان تزریق خون و مصرف دسفرال و تعداد لنفوسیت های  $CD3+CD8+CD27+$  با سن، تزریق خون و مصرف دسفرال همبستگی معکوس داشت. نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می توان گفت که بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور که از نظر هپاتیت B و C منفی هستند اختلالات خفیف سلول T دارند. افزایش متوسط زیر گروه لنفوسیتی  $CD3+CD27-$  احتمالاً منعکس کننده تحریک آنتی ژنیک غیر اختصاصی است و این پدیده می تواند با ارتباط منفی بین سن، میزان تزریق خون و درمان دفع آهن با فراوانی سلول های  $CD3+CD27+$  توضیح داده شود.

واژه های کلیدی: لنفوسیت T، تالاسمی ماژور، پیری ایمنی، لنفوسیت  $CD27-$ .

### مقدمه:

تالاسمی گروهی ناهمگون از اختلالات ژنتیکی است که در اثر کاهش سرعت ساخت یکی از زنجیره های هموگلوبین و اغلب زنجیره  $\alpha$  یا  $\beta$  به وجود می آید. در کشور های حوالی مدیترانه و خاورمیانه شیوع  $\beta$  تالاسمی

تالاسمی گروهی ناهمگون از اختلالات ژنتیکی است که در اثر کاهش سرعت ساخت یکی از زنجیره های هموگلوبین و اغلب زنجیره  $\alpha$  یا  $\beta$  به وجود می آید. در کشور های حوالی مدیترانه و خاورمیانه شیوع  $\beta$  تالاسمی

IVSI-V(G→C) به صورت شایع در نواحی جنوبی ایران مشاهده می شود (۲). میزان شیوع  $\beta$  تالاسمی در اصفهان، فارس و نواحی جنوب شرقی ۸-۱۰ درصد برآورد شده است (۳).

از راهکارهای درمانی رایج در این بیماری تزریق متعدد و منظم خونی است که بدنبال آن درمان دفع آهن جهت کنترل عوارض ناشی از اضافه بار آهن توصیه می گردد (۱). اسپلنکتومی (Splenectomy)، انتخاب بعدی درمانی است که جهت کاهش نیاز به خون و حفظ هموگلوبین پیشنهاد می شود (۴). با این وجود عوارض درمان، کیفیت زندگی افراد را تحت تأثیر قرار می دهد (۳). عوارض عفونی از اصلی ترین عوامل بیماری زا و دومین عامل مرگ و میر در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور به حساب می آیند که تصور می شود ناشی از ناهنجاری های ایمونولوژیکی باشند (۴). به همین دلیل در سال های اخیر بررسی های زیادی جهت مطالعه اختلالات ایمنی سلولی و همورال در این بیماران صورت گرفته است و طیف وسیعی از ناهنجاری های ایمنی در آن ها گزارش شده است (۵-۷).

تحریک مداوم آنتی ژنی و انتقال ویروس ها با خصوصیات سرکوبگری ایمنی نظیر HCV، HBV و CMV طی تزریق خون های مکرر منجر به تسریع فرآیند پیری ایمنی می گردد (۸-۱۰). وجود شرایط اکسیداتیو که از فاکتورهای عمده جهت پیشرفت پیری ایمنی است، در مبتلایان به بتا تالاسمی ماژور به دلیل تزریق خون های مداوم و همولیز دیده می شود (۱۱-۱۳). از طرفی اسپلنکتومی علاوه بر ناتوان کردن سیستم ایمنی در حفاظت در برابر باکتری های کپسولدار منجر به تشدید عوارض ناشی از تزریق خون مداوم بر سیستم ایمنی می گردد (۳).

در مطالعه حاضر زیر گروه های لنفوسیت ها با استفاده از فلوسایتومتری ۴ کاناله مورد بررسی و پیری ایمنی از دیدگاه تغییرات CD4/CD8 و بیان CD27 مورد توجه قرار گرفته است. مولکول های CD27 پس از تحریک آنتی ژنیک در سطح سلول ها کاهش

می یابند (۱۴) و نشانه ای از پیری ایمنی هستند. با توجه به اینکه بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور با تزریق خون مکرر در معرض برخورد مداوم با آنتی ژن های متفاوت هستند، از این رو بررسی این زیر گروه از لنفوسیت ها نیز در آنها با اهمیت به نظر می رسد. علاوه بر این تأثیر عواملی نظیر سن، میزان فریتین و میزان تزریق خون بر تغییر این فنوتیپ مورد بررسی قرار گرفته است.

### روش بررسی:

این مطالعه توصیفی - مقطعی بر روی ۲۷ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی ماژور (تعیین شده توسط آزمایشات کلینیکی و پاراکلینیکی، با رنج سنی ۳۰-۱۰ سال) مراجعه کننده به کلینیک تالاسمی هاجر شهرکرد در سال ۱۳۹۰ صورت گرفت.

همه بیماران دارای تزریق منظم خونی (با میانگین فاصله زمانی ۲۰ روز) جهت حفظ هموگلوبین  $10\text{ gr/dl}$  بودند و از دسفرال زیر جلدی استفاده می کردند. بیمارانی که عفونت هپاتیت B یا C، سابقه HIV مثبت، درمان دفع آهن با دفریپرون، حاملگی، مصرف ویتامین C یا اسیدفولیک ۲۴ ساعت قبل از نمونه گیری داشتند از مطالعه خارج شدند. گروه شاهد نیز شامل یک گروه ۲۶ نفره از افراد سالم بدون هیچگونه سابقه کم خونی بودند که از لحاظ سن و جنس با بیماران مطابقت داشتند (دارای رنج سنی ۳۱-۱۱ سال)، همچنین در طول مدت زمان جمع آوری نمونه ها اطمینان حاصل شد که هیچگونه بیماری مزمن و حاد عفونی نداشته باشند.

در این مطالعه همه بیماران دارای شرایط ورود و رضایت نامه در مطالعه شرکت داده شدند و برای انجام مطالعه ۵ میلی لیتر نمونه خون کامل از بیماران و افراد گروه شاهد در لوله های حاوی ضد انعقاد هپارین سدیم جمع آوری شد (نمونه خون بیمار قبل از تزریق خون گرفته شد). سپس جهت لیز گلبول های قرمز، لوله های حاوی مقدار مناسب نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با ماده لیز کننده FACS lysing

انکوبه شدند. سپس لوله ها سانتریفوژ و در بافر فسفات سالین (Posphate buffered saline=PBS) حاوی آلبومین سرم گاوی ۵ درصد (Bovine serum albumin=BSA) و ۰/۱ درصد سدیم آزید شستشو داده شدند.

در ادامه سلول ها مستقیماً با آنتی بادی های منوکلونال به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS حاوی ۵ درصد BSA و ۰/۱ درصد سدیم آزید مورد آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفتند (۱۵).

ابتدا نمونه ها جهت خارج کردن پلاکت، گرانولوسیت ها، منوسیت ها و جداسازی جمعیت لنفوسیتی روی نمودار FSC/SSC جدا شدند. بدین ترتیب حداقل ۳۰۰۰۰ سلول در ناحیه لنفوسیت ها بدست آمد. سپس لنفوسیت های CD3+ از روی شدت فلورسنس PE، مشخص شدند و نمودار نقطه ای دو پارامتری از CD8 و CD4 مقابل CD27 جهت نمایش درصد رنگ آمیزی مورد نظر در دو زیر رده CD4+ و CD8+ ترسیم شد. در انتها آنالیز فلوسایتومتری توسط نرم افزار FLOMAX صورت گرفت.

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در مطالعه از شرکت Becton Dickenson خریداری شدند که شامل: Anti-CD4 (APC), Anti-CD8 (PE-cy5), Control Anti-CD27 FITC Anti-CD3 (PE), MS IgG2bk isotypes; MS IgG1κ بودند.

در نهایت، تعداد سلول ها در هر مورد با توجه به داده های بدست آمده از فلوسایتومتری و آنالیز نرم افزار FLOMAX و نیز شمارش کامل خونی محاسبه گردید و داده ها در نرم افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون های آماری Mann-Withney و همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شدند.

## یافته ها:

بیماران شرکت کننده در مطالعه را ۲۷ نفر با میانگین سنی  $5/02 \pm 17/7$  تشکیل می دادند که ۶۳ درصد آن ها مرد بودند. گروه شاهد نیز شامل یک گروه ۲۶ نفره از افراد سالم با میانگین سنی  $6/1 \pm 19/6$  شامل ۵۷/۷ درصد مرد بودند. فاصله تزریق خون در

بیماران  $0/3 \pm 3/2$  هفته، میزان فریتین سرم  $954/8 \pm 1529/3$  ng/dl و میزان مصرف دسفرال  $0/8 \pm 5/2$  شب در هفته بود.

تعداد گلبول های سفید (WBC) در بیماران بیش از گروه شاهد بود، اما رابطه معنی دار آماری بین شمارش WBC بیماران ( $8733/5 \pm 8594/10$  در میلیتر مکعب) در مقایسه با گروه شاهد ( $818/98 \pm 5134/13$  در میلیتر مکعب) مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). در بیماران در مقایسه با گروه شاهد لنفوسیتوز چشمگیری مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). از طرفی درصد لنفوسیت های T در بیماران ( $24/02 \pm 28/63$ ) در مقایسه با گروه شاهد ( $14/87 \pm 54/81$ ) کاهش بسیار معناداری داشت ( $P < 0/001$ ). درصد و تعداد مطلق سلول های CD4+ و CD8+ در بیماران در مقایسه با گروه شاهد تغییر معنی داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ) (جدول شماره ۱).

میزان کاهش تعداد لنفوسیت CD3+CD4+CD27+ در بیماران نسبت به گروه شاهد به طور جزئی معنی دار بود ( $P = 0/07$ )، اما تعداد لنفوسیت های CD3+CD8+CD27+ تفاوت چشمگیری در بیماران نسبت به گروه شاهد نداشت ( $P > 0/05$ ) (جدول شماره ۲).

با توجه به کاهش معنی دار تعداد لنفوسیت ها در بیماران نسبت به گروه شاهد، تأثیر سن، میزان فریتین، تزریق خون و میزان دسفرال مصرفی بر تعداد لنفوسیت های T مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات هیچ یک از موارد فوق با تعداد سلول T همبستگی معنی داری نداشت ( $P > 0/05$ ). همچنین تعداد لنفوسیت های CD3+CD4+CD27+ با میزان تزریق خون و مصرف دسفرال همبستگی معکوس معنی داری داشت ( $P < 0/05$ )، در حالی که این همبستگی بین این جمعیت سلولی با سن و میزان فریتین وجود نداشت و تعداد لنفوسیت CD3+CD8+CD27+ با کلیه شاخص غیر از میزان فریتین همبستگی معکوس معنی داری داشت (جدول شماره ۳).

**جدول شماره ۱: مقایسه شاخص های ایمنولوژیک در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور در مقایسه با گروه شاهد**

گروه ها	بیمار (۲۷ نفر)	شاهد (۲۶ نفر)	سطح معنی داری	شاخص های ایمنولوژیک
تعداد لوکوسیت در میلیتر مکعب	$8594/10 \pm 8733/5$	$5134/13 \pm 818/89$	$>0/05$	
تعداد لنفوسیت در میلیتر مکعب	$6204/6 \pm 7984/22$	$2122/21 \pm 543/7$	$<0/001$	
درصد لنفوسیت CD3+	$28/63 \pm 24/02$	$54/81 \pm 14/87$	$<0/001$	
تعداد لنفوسیت CD4+T در میلیتر مکعب	$576/73 \pm 45/13$	$644/15 \pm 294/5$	$>0/05$	
تعداد لنفوسیت CD8+T در میلیتر مکعب	$405/35 \pm 201/17$	$417/04 \pm 155/44$	$>0/05$	
نسبت CD4/CD8	$1/42^*$	$1/54^*$	$>0/05$	

داده ها به صورت "میانگین  $\pm$  انحراف معیار" می باشند؛ CD: دسته تمایزی؛ \* داده ها به صورت نسبت بیان شده اند.

**جدول شماره ۲: مقایسه میزان لنفوسیت های CD27+ در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور و گروه شاهد**

گروه ها	بیمار (۲۷ نفر)	شاهد (۲۶ نفر)	سطح معنی داری	نوع سلول
لنفوسیت CD3+CD4+CD27+	$275/71 \pm 196/45$	$476/95 \pm 255/33$	$0/07$	
لنفوسیت CD3+CD8+CD27+	$236/83 \pm 160/68$	$298/68 \pm 119/34$	$0/32$	

داده ها به صورت "میانگین  $\pm$  انحراف معیار" می باشند؛ CD: دسته تمایزی.

**جدول شماره ۳: نتایج همبستگی بین شمارش لنفوسیت های T و لنفوسیت های CD27+ T در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور**

نوع سلول	فاکتورهای مرتبط	سن	میزان فریتین	میزان تزریق خون	میزان مصرف دسفرال
لنفوسیت T	ضریب همبستگی	$-0/27$	$0/13$	$-0/26$	$-0/11$
	ارزش P	$0/17$	$0/54$	$0/18$	$0/60$
لنفوسیت CD3+CD4+CD27+	ضریب همبستگی	$-0/29$	$-0/55$	$-0/62$	$-0/71$
	ارزش P	$0/18$	$0/89$	$0/04$	$0/02$
لنفوسیت CD3+CD8+CD27+	ضریب همبستگی	$-0/43$	$-0/19$	$-0/65$	$-0/71$
	ارزش P	$0/04$	$0/60$	$0/03$	$0/02$

CD: دسته تمایز

## بحث:

وجود ناهنجاری های ایمنولوژیکی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور نظیر نقص در فعال سازی کمپلمان و فعالیت ماکروفاژ، تغییر در تعداد و عملکرد لنفوسیت ها و نقص در تولید سایتوکین ها گزارش شده است (۱۶). مکانیسم دقیق این ناهنجاری ها مشخص نیست، اما ممکن است با اضافه بار آهن، تزریقات متعدد خون و ورود آنتی ژن های آلورژیک به بدن و استفاده از عوامل دفع کننده آهن ارتباط داشته باشد (۹، ۱۷، ۱۸). در بیماران طحال برداری شده و نیز مبتلا به کم کاری طحال لنفوسیتوز به وجود می آید و در بیماران تالاسمی می تواند با برداشت طحال و نیز با تحریکات مداوم آنتی ژنیک ارتباط داشته باشد (۱۰). خارج کردن طحال می تواند موجب تخلیه لنفوسیت های T در این بیماران گردد (۱۹).

در مطالعه ما نسبت CD4/CD8 تغییر معنی داری با شاهد نداشت که با مطالعه ای که توسط Hodg و همکاران انجام شده و تنها در درصد کمی از بیماران نسبت معکوس شده است، هم سویی دارد (۲۰)، در حالی که در مطالعات دیگری معکوس شدن این نسبت گزارش شده است (۲۱). با توجه به اینکه بیماران مورد مطالعه ما از نظر هپاتیت B و C منفی بودند، این موضوع می تواند نسبت طبیعی CD4/CD8 را تا حدی تفسیر نماید.

در بررسی همبستگی بین تعداد لنفوسیت های T و سن بیماران، میزان فریتین، تزریق خون و مصرف دسفرال ارتباط معنی داری مشاهده نگردید. با توجه به اینکه طحال نقش اساسی در کنترل تعداد سلول T دارد و در بین بیماران، ۱۲ نفر طحال برداری شده اند، این موضوع می تواند نقش فاکتورهای دیگر را تحت تأثیر قرار دهد.

یکی از نکات برجسته مطالعه حاضر تغییر بیان CD27 بر سطح لنفوسیت T بود. سلول های خاطره ای اجرایی CD27- هستند (۲۲) و تصور می شود در

برخورد با آنتی ژن این مولکول را از دست می دهند. در افراد سالخورده کاهش بیان آن در سطح لنفوسیت های T دیده شده است (۲۳) و علاوه بر این سلول های دارای میزان بالای CD27 در بین لنفوسیت های اختصاصی ویروس یافت نشده است (۲۴) که نشان می دهد پس از برخورد با آنتی ژن این لنفوسیت ها آن را از دست داده اند. هر دو دسته سلول خاطره ای اجرایی یعنی CD45RO+ و CD45RA+ از نظر CD27 منفی هستند (۲۵). در سلول های B نیز زیر گروه لنفوسیت های CD27-IgD با افزایش سن افزایش می یابد (۲۶). در مطالعه انجام شده توسط Alboreda و همکاران نیز درصد بالایی از سلول های CD28-CD27-CD45RA در بیماران آلوده به تریپانوزوم دیده شده است (۲۷). در عفونت HIV بیماران با دوز بالاتر ویروس دارای جمعیت سلولی بیشتری از نوع CD27-CCR7- و CD45RO+ هستند (۲۸). در کلیه مطالعات فوق برخورد های مزمن آنتی ژنیک تأثیر منفی بر بیان مولکول CD27 در سطح لنفوسیت ها داشته است و در مطالعه ما نیز میزان بروز این مولکول در بیماران در هر دو جمعیت CD4 و CD8 کمتر از گروه شاهد بوده است، هر چند این تفاوت تنها در زیر گروه CD4 به طور جزئی معنی دار بود که می تواند به علت برخورد مزمن با آنتی ژن های مختلف از جمله به علت انتقال خون آلورژیک باشد. با توجه به تعداد محدود بیماران مورد مطالعه جهت بررسی این فتوتیپ، شاید نیاز به بررسی بیشتری در این زمینه باشد.

در مطالعه حاضر در زیر گروه CD4 بین میزان این سلول ها با تزریق خون و مصرف دسفرال ارتباط معنی داری مشاهده گردید. همچنین بین میزان لنفوسیت های CD27+T و سن بیماران همبستگی منفی وجود داشت که در جمعیت لنفوسیت CD8 به سطح معنی داری رسید. با توجه به اینکه با افزایش سن میزان برخورد با آنتی ژن ها خصوصاً در این بیماران افزایش

دارد، این یافته قابل انتظار است. تعداد واحد خون مصرفی با تعداد لنفوسیت های CD27 مثبت در هر دو گروه لنفوسیت های CD4 و CD8 همبستگی منفی داشت. با در نظر گرفتن اینکه تزریق هر واحد خون سیستم ایمنی را در معرض آنتی ژن های آلورژنیک قرار دهد، این پدیده می تواند با کاهش میزان لنفوسیت های CD3+CD27+ ارتباط داشته باشد. هر چند افزایش فریتین می تواند بر عملکرد سیستم ایمنی اثر منفی داشته باشد، اما ظاهراً بر بیان فتوتیپ CD27 در لنفوسیت T تأثیری نداشته است و همبستگی معنی داری بین میزان فریتین و این فتوتیپ یافت نشد. با توجه به اینکه فریتین علاوه بر اینکه با ذخیره آهن بدن ارتباط دارد، در التهابات و بعضی از شرایط پاتولوژیک دیگر نیز افزایش می یابد، باید در خصوص تأثیر آن بر تغییرات زیر گروه های لنفوسیت ها بررسی های بیشتری صورت گیرد.

افزایش متوسط زیر گروه سلول های CD3+ CD27- از لنفوسیت ها، احتمالاً منعکس کننده تحریک آنتی ژنیک غیر اختصاصی است و این پدیده می تواند با ارتباط منفی بین سن، میزان تزریق خون و درمان دفع آهن با فراوانی سلول های CD3+ CD27- توضیح داده شود. در صورت استفاده از فراورده های خونی حاوی گلبول های قرمز جوان تر و متعاقب آن کاهش نیاز به خون و نیز کاهش نیاز به داروهای دفع آهن می توان تا حد زیادی از پیری زودرس سیستم ایمنی در این بیماران پیشگیری کرد. با توجه به اینکه مطالعه حاضر در بیماران با سن بیش از ۱۰ سال انجام شده است، پیشنهاد می گردد جهت بررسی این نوع تغییرات و پدیده پیری زودرس، ایمنی بیماران با سنین کمتر نیز مورد بررسی قرار گیرند. همچنین بررسی سایر شاخص های پیری سیستم ایمنی در این بیماران توصیه می گردد.

## نتیجه گیری:

بر اساس نتایج این مطالعه بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور که از نظر هپاتیت B و C و HIV منفی هستند، تنها تغییرات جزئی نسبت CD4/CD8 در لنفوسیت های T دارند و این بیماران در طول این دوران از بیماری، اختلالات خفیف سلول T را نشان می دهند.

## تشکر و قدردانی:

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی انجام شده است که بدینوسیله از آنها سپاسگزاری می گردد. همچنین از بخش تالاسمی بیمارستان هاجر و بیماران شرکت کننده در طرح قدردانی می گردد.

## منابع:

1. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5: 11.
2. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin. 2001 Aug; 25(3): 285-96.
3. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, et al. Survival and complications in thalassemia. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1054: 40-7.
4. Vento S, Cainelli F, Cesario F. Infections and thalassaemia. Lancet Infect Dis. 2006 Apr; 6(4): 226-33.
5. Bao W, Zhong H, Li X, Lee MT, Schwartz J, Sheth S, et al. Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and beta-thalassemia major. Am J Hematol. 2011 Dec; 86(12): 1001-6.
6. Al-Awadhi AM, Alfadhli SM, Al-Khaldi D, Borhama M, Borusly M. Investigation of the distribution of lymphocyte subsets and zinc levels in multitransfused beta-thalassemia major patients. Int J Lab Hematol. 2010 Apr; 32(2): 191-6.

7. Gharagozloo M, Karimi M, Amirghofran Z. Double-faced cell-mediated immunity in beta-thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity. *Ann Hematol.* 2009 Jan; 88(1): 21-7.
8. Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi SE, Hourfar H, et al. Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. *Int Immunopharmacol.* 2006 Aug; 6(8): 1305-10.
9. Gharagozloo M, Bagherpour B, Tahanian M, Oreizy F, Amirghofran Z, Sadeghi HM, et al. Premature senescence of T lymphocytes from patients with beta-thalassemia major. *Immunol Lett.* 2009 Jan 29; 122(1): 84-8.
10. Zimring JC, Hair GA, Deshpande SS, Horan JT. Immunization to minor histocompatibility antigens on transfused RBCs through crosspriming into recipient MHC class I pathways. *Blood.* 2006 Jan; 107(1): 187-9.
11. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, Haj Khelil A, Feki M, Amri F, et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clin Chim Acta.* 2003 Dec; 338(1-2): 79-86.
12. Rachmilewitz EA, Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Rechavi G, Breda L, et al. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054(1): 118-23.
13. Schrier SL, Centis F, Verneris M, Ma L, Angelucci E. The role of oxidant injury in the pathophysiology of human thalassemias. *Redox Rep.* 2003; 8(5): 241-5.
14. Van Baarle D, Tsegaye A, Miedema F, Akbar A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol Lett.* 2005 Feb 15; 97(1): 19-29.
15. Pourgheysari B, Bruton R, Parry H, Billingham L, Fegan C, Murray J, et al. The number of cytomegalovirus-specific CD4 + T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire. *Blood.* 2010 Oct; 116(16): 2968-74.
16. Consolini R, Calleri A, Legitimo A, Massei F. Immunological evaluation of patients with beta-thalassemia major. *Acta Haematol.* 2001; 105(1): 7-12.
17. Farmakis D, Giakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. *Med Sci Monit.* 2003 Jan; 9(1): 19-22.
18. Ricerca BM, Di Girolamo A, Rund D. Infections in thalassemia and hemoglobinopathies: focus on therapy-related complications. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009; 1(1): e2009028.
19. Dwyer J, Wood C, McNamara J, Williams A, Andiman W, Rink L, et al. Abnormalities in the immune system of children with beta-thalassaemia major. *Clin Exp Immunol.* 1987 Jun; 68(3): 621-9.
20. Hodge G, Lloyd JV, Hodge S, Story C, Han P. Functional lymphocyte immunophenotypes observed in thalassaemia and haemophilia patients receiving current blood product preparations. *Br J Haematol.* 1999 Jun; 105(3): 817-25.
21. Al-Ofairi BA, Barakat AB, Ghanim Hel D, Shehata IH, El-Sayed MH. A study of innate and adaptive immune responses in beta-thalassemic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Egypt J Immunol.* 2011; 18(1): 61-76.
22. Van den Hove LE, Vandenbergh P, Van Gool SW, Ceuppens JL, Demuyneck H, Verhoef GE, et al. Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment. *Leuk Res.* 1998 Feb; 22(2): 175-84.

23. Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA. The cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response expands with age and markedly alters the CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire. *J Virol*. 2007 Jul; 81(14): 7759-65.
24. Kern F, Khatamzas E, Sural I, Frommel C, Reinke P, Waldrop SL, et al. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. Subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol*. 1999 Sep; 29(9): 2908-15.
25. Mendez-Lagares G, Diaz L, Correa-Rocha R, Leon Leal JA, Ferrando-Martinez S, Ruiz-Mateos E, et al. Specific patterns of CD4-associated immunosenescence in vertically HIV-infected subjects. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Jun; 19(6): 558-65.
26. Bulati M, Buffa S, Candore G, Caruso C, Dunn-Walters DK, Pellicano M, et al. B cells and immunosenescence: a focus on IgG+IgD-CD27- (DN) B cells in aged humans. *Ageing Res Rev*. 2011 Apr; 10(2): 274-84.
27. Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M. Assessment of CD8(+) T cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 May; 82(5): 861-4.
28. Burgers WA, Riou C, Mlotshwa M, Maenetje P, de Assis Rosa D, Brenchley J, et al. Association of HIV-specific and total CD8<sup>+</sup> T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point. *J Immunol*. 2009 Apr; 182(8): 4751-61



## Frequency of T lymphocyte subsets in major beta-thalassemia patients and the influencing factors

Karimi L (MSc student)<sup>1</sup>, Beshkar P (MSc)<sup>1</sup>, Shirzad H (PhD)<sup>1</sup>, Kheiri S (PhD)<sup>2</sup>,  
Rasti M (BSc)<sup>3</sup>, Nourbakhsh MK (MD)<sup>3</sup>, Pourgheysari B (PhD)<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>3</sup>Pediatric Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>4</sup>Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran

Received: 18/Dec/2012      Revised: 4/Feb/2013      Accepted: 10/Feb/2013

**Background and aims:** Of common therapeutically methods among thalassemia patients are repeated transfusion and iron-chelation therapy. Infectious complications are considered as serious problems among thalassemia patients, which could be derived from immunologic abnormalities. In the present study, the frequency of main subsets of T lymphocytes and CD3+ CD27+ lymphocytes and the association between these changes and age, blood transfusion rate, serum ferritin, and iron-chelation therapy were examined.

**Methods:** In this cross-sectional study, 27 patients (10-30 years old) with major thalassemia, according to clinical and experimental criteria, referring to Hajar Hospital of Shahrekord in 2011 were enrolled. Control group included 26 healthy people matched with the patients by age and gender. Venous blood samples were collected in the tubes containing sodium heparin, stained with labeled monoclonal fluorescent antibodies after red cells' lysis, and analyzed by flowcytometrically. The number of cells was calculated according to the above analysis' results and blood cell count. The data were analyzed by SPSS using Mann-Whitney and Spearman correlation.

**Results:** The absolute number of lymphocytes in the patients was significantly higher than that in the control group and the percentage of T lymphocytes was significantly lower in the patients compared to the control group ( $P < 0.001$ ). The number of T lymphocytes in both groups of CD4 and CD8 was not significantly different between the patients and the control group ( $P > 0.05$ ). The frequency of CD3+ CD7+ lymphocytes in both cell types of CD4 and CD8 was lower in the patients compared to the control group. This difference was partially significant only in CD4 subset ( $P = 0.07$ ). The number of CD3+CD4+CD27+ lymphocytes was inversely correlated with blood transfusion rate and desferal consumption, and the number of CD3+CD8+CD27+ lymphocytes was inversely correlated with age, blood transfusion, and desferal consumption.

**Conclusion:** Regarding the results, it can be concluded that the patients with major thalassemia who are hepatitis B- and hepatitis C-negative have T cell mild disorders. The moderate increase in CD3+CD27- lymphocyte subset possibly reflects unspecific antigenic stimulation, probably explained by negative association between age, blood transfusion rate, and iron-chelation and the frequency of CD3+CD27+ cells.

**Keywords:** CD27- lymphocyte, T lymphocyte, Immunosenescence, Major thalassemia.

**Cite this article as:** Karimi L, Beshkar P, Shirzad H, Kheiri S, Rasti M, Nourbakhsh MK, Pourgheysari B. Frequency of T lymphocyte subsets in major beta-thalassemia patients and the influencing factors. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Oct, Nov; 15(4): 7-15.

**\*Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983813336720, E-mail: bat238@yahoo.com